

脱钙骨基质与慢病毒介导沉默 P75 神经营养因子受体转染骨髓间充质干细胞构建组织工程骨

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2361>

陈俊毅¹, 王宁¹, 彭称飞², 朱伦井¹, 段江涛¹, 王焯¹, 贝朝涌¹

2095-4344.2361

投稿日期: 2020-02-19

送审日期: 2020-03-26

采用日期: 2020-04-15

在线日期: 2020-08-20

中图分类号:

R459.9; R394.2; R318

文章编号:

2095-4344(2021)04-00510-06

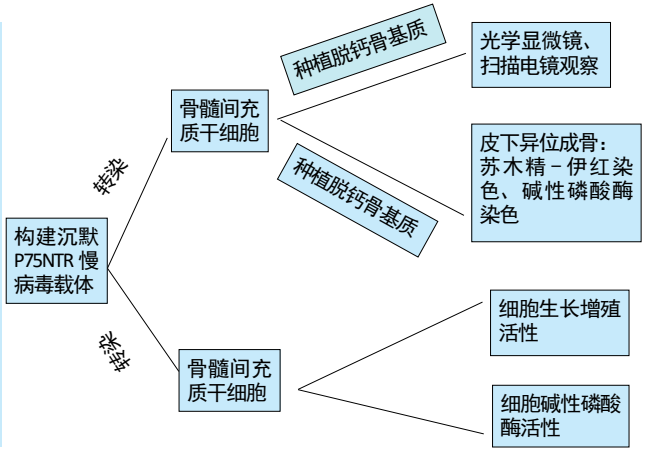
文献标识码: A

文章快速阅读:

文章描述—

△ P75NTR 具有广泛的生物功能, 在骨组织中发挥着促进或抑制双向作用, 其抑制作用与其介导的凋亡通路相关, 理论上关闭 P75NTR 凋亡通路可以提高细胞的活性和成骨分化作用;

△ 实验发现沉默 P75NTR 可以提高骨髓间充质干细胞活性和碱性磷酸酶活性, 复合脱钙骨基质可形成良好的组织工程骨复合体, 具有一定的异位成骨作用, 初步阐明 P75NTR 用于骨组织工程治疗骨缺损的理论基础和前景。



文题释义:

P75神经营养因子受体: 是神经生长因子的低亲和力受体, 与神经生长因子结合可以激活细胞凋亡通路, 大量神经生长因子可以关闭P75神经营养因子受体介导的凋亡通路, P75神经营养因子受体在骨组织中发挥着促进或抑制双向作用。

骨髓间充质干细胞: 是一种成体干细胞, 有取材方便、易于培养、免疫原性低及体外诱导培养稳定等优点, 能够定向分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞和神经细胞等。

摘要

背景: P75神经营养因子受体(P75 neurotrophin receptor, P75NTR)在骨组织中具有促进和抑制骨形成的双向作用, P75NTR过表达可抑制骨髓间充质干细胞的成骨矿化作用。P75NTR可抑制纤维蛋白的降解和骨折周围新生血管的生成导致骨折不愈合, 其抑制骨组织修复与其介导凋亡通道有关。

目的: 研究沉默P75NTR对骨髓间充质干细胞生长活性和碱性磷酸酶活性的影响, 以及种植于脱钙骨基质构建组织工程骨复合体的体内异位成骨能力。

方法: 慢病毒介导沉默P75NTR转染大鼠骨髓间充质干细胞, 荧光倒置相差显微镜和Western blot检测荧光蛋白表达和P75NTR蛋白表达; 转染两三天后CCK-8实验检测细胞活性, 成骨诱导分化培养7 d和14 d, 酶标法检测碱性磷酸酶活性; 慢病毒介导沉默P75NTR转染骨髓间充质干细胞复合脱钙骨基质培养, 光学倒置相差显微镜和扫描电镜下观察脱钙骨基质和骨髓间充质干细胞黏附情况, 进一步成骨诱导分化培养7 d, 将组织工程骨复合体移植大鼠双侧背部皮下4周, 苏木精-伊红染色和碱性磷酸酶染色观察成骨情况。

结果与结论: ①慢病毒介导沉默P75NTR转染率可达70%左右, P75NTR目的蛋白表达明显低于未转染组和阴性病毒对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); ②与未转染组和阴性病毒对照组比较, 沉默P75NTR转染组第5, 6天的细胞活性明显增加, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 与未转染组和阴性病毒对照组比较, 沉默P75NTR转染组成骨诱导第7, 14天的碱性磷酸酶活性显著增高($P < 0.05$); ③沉默P75NTR转染骨髓间充质干细胞与脱钙骨基质可以形成良好黏附, 该组织工程骨复合体在皮下异位成骨能力显著增强; ④结果表明, 慢病毒介导沉默P75NTR转染大鼠骨髓基质干细胞种植于脱钙骨基质可制作成良好的骨组织工程骨复合体, 该组织工程骨复合体具有一定的异位成骨作用, 为骨组织工程治疗骨缺损提供重要的理论基础。

关键词: 干细胞; 骨髓间充质干细胞; 材料; 因子; 异位; 成骨; 大鼠; 慢病毒

缩略语: 骨髓间充质干细胞: bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs; P75神经营养因子受体: P75 neurotrophin receptor, P75NTR

Decalcified bone matrix and lentivirus-mediated silencing of P75 neurotrophin receptor transfected bone marrow mesenchymal stem cells to construct tissue-engineered bone

Chen Junyi¹, Wang Ning¹, Peng Chengfei², Zhu Lunjing¹, Duan Jiangtao¹, Wang Ye¹, Bei Chaoyong¹

¹Department of Orthopedic Trauma, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

¹ 桂林医学院附属医院四肢创伤骨科, 广西壮族自治区桂林市 541001; ² 广西壮族自治区南溪山医院, 广西壮族自治区桂林市 541002

第一作者: 陈俊毅, 男, 1993年生, 福建省泉州市人, 汉族, 桂林医学院在读硕士, 主要从事骨组织工程、骨缺损修复及断指(趾)再植研究。

通讯作者: 贝朝涌, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 桂林医学院附属医院四肢创伤骨科, 广西壮族自治区桂林市 541001

<https://orcid.org/0000-0002-7521-0243> (陈俊毅)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81660366), 项目负责人: 贝朝涌

引用本文: 陈俊毅, 王宁, 彭称飞, 朱伦井, 段江涛, 王焯, 贝朝涌. 脱钙骨基质与慢病毒介导沉默 P75 神经营养因子受体转染骨髓间充质干细胞构建组织工程骨 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(4):510-515.



Chen Junyi, Master candidate, Department of Orthopedic Trauma, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Bei Chaoyong, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Orthopedic Trauma, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: P75 neurotrophin receptor (P75NTR) has a bidirectional role in promoting and inhibiting bone formation in bone tissue. Overexpression of P75NTR can inhibit the osteogenic mineralization of bone marrow mesenchymal stem cells. P75NTR can inhibit the degradation of fibrin and the formation of new blood vessels around the fracture, leading to fracture nonunion. Its inhibition of bone tissue repair is related to its mediating apoptosis channels.

OBJECTIVE: To study the effect of silencing P75NTR on the growth activity and alkaline phosphatase activity of bone marrow mesenchymal stem cells, and to study the ectopic osteogenesis ability implanted in demineralized bone matrix to construct tissue engineering bone complex.

METHODS: Lentivirus-mediated silencing P75NTR was transfected into bone marrow mesenchymal stem cells. The expression of fluorescent protein and P75NTR protein was detected by fluorescence inverted phase contrast microscope and western blot assay. Two or three days after transfection, CCK-8 assay was used to detect cell activity. After osteogenic induction solution induced differentiation culture for 7 and 14 days, alkaline phosphatase activity was detected by enzyme labeling method. Lentivirus-mediated silencing P75NTR transfected bone marrow mesenchymal stem cells were cultured with compound demineralized bone matrix. Optical inverted phase contrast microscope and scanning electron microscope were used to observe the adhesion of demineralized bone matrix and bone marrow mesenchymal stem cells. After further osteogenic differentiation for 7 days, tissue engineered bone complex was subcutaneously implanted in the rat back for 4 weeks. The osteogenesis was observed by hematoxylin-eosin staining and alkaline phosphatase staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Lentiviral-mediated silencing P75NTR transfection rate was approximately 70%. The expression of P75NTR target protein was significantly lower than that of untransfected group and negative virus control group ($P < 0.05$). (2) Compared with untransfected group and negative virus control group, the cell activity of silencing P75NTR transfected group increased significantly at 5 and 6 days ($P < 0.05$). Compared with the untransfected group and the negative virus control group, the alkaline phosphatase activity of silencing P75NTR transfected group increased significantly at 7 and 14 days after osteogenic induction ($P < 0.05$). (3) Silencing P75NTR transfected bone marrow mesenchymal stem cells and demineralized bone matrix formed a good adhesion; the tissue engineered bone complex significantly enhanced the ability of ectopic bone formation. (4) The results showed that bone marrow mesenchymal stem cells transfected with silencing P75NTR mediated by lentivirus could be implanted in decalcified bone matrix to form a good tissue engineered bone complex, which has a certain heterotopic osteogenesis effect and provides important theoretical basis for bone tissue engineering in the treatment of bone defects.

Key words: stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; materials; factors; ectopic; osteogenesis; rats; lentivirus

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81660366 (to BCY)

How to cite this article: CHEN JY, WANG N, PENG CF, ZHU LJ, DUAN JT, WANG Y, BEI CY. Decalcified bone matrix and lentivirus-mediated silencing of P75 neurotrophin receptor transfected bone marrow mesenchymal stem cells to construct tissue-engineered bone. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(4):510-515.

0 引言 Introduction

骨折是临床常见的疾病, 通常需要手术治疗。研究表明, 细胞治疗有助于持续改善骨质, 骨再生的细胞和分子基础将被视为骨折不愈合的基础疗法^[1]。P75 神经生长因子受体 (P75 neurotrophin receptor, P75NTR) 是神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 的低亲和力受体, 许多研究者已经将 JNK 通道与细胞凋亡联系起来, 并且一些研究表明神经生长因子与 p75NTR 的结合可以通过激活 JNK 通道, 促进细胞凋亡^[2]。研究已发现 p75NTR 在不同的生物系统如免疫、血管、神经和骨骼系统中起着重要作用。P75NTR 可以促进小鼠脑浦肯野成纤维细胞凋亡^[3], P75NTR 的高表达还可以抑制四肢血管、肺血管和视网膜色素上皮细胞血管再生^[4-5]。p75NTR 是影响眼睛、大脑、心脏和周围肢体的多种缺血性血管疾病的主要参与者, 其表达随神经血管损伤而显著增加^[6-8]。目前研究证实 P75NTR 在骨骼组织的再生和修复过程中具有双向性作用, 还有研究报道 P75NTR 可以调节干细胞特性和稳定^[9]。在传代过程中, p75NTR 阳性骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 表现出更稳定的增殖能力和干细胞学特性^[10]。在脂肪干细胞中诱导成骨显示, 抗 p75NTR 具有很高的成骨分化潜能^[11]。EDALAT 等^[12] 研究发现 P75NTR 对成骨作用有负调节作用, P75NTR 的过表达可以直接促进 BMSCs 凋亡。P75NTR 发挥抑制成骨作用的机制主要是通过其介导的凋亡通路, 理论上沉默 P75NTR 可以关闭该凋亡通路, 提高细胞活性和促进成骨作用^[13-14]。种子细胞、细胞因子、支架材料构成了组

织工程的 3 要素, 脱钙骨基质具有良好的成骨诱导性和传导性, 在骨组织工程治疗骨缺损中起到重要作用。

该研究探讨沉默 P75NTR 对大鼠 BMSCs 生长活性和成骨分化的影响, 然后种植于脱钙骨基质构建组织工程骨复合体, 进一步检测成骨能力, 为其治疗骨折不愈合的研究提供理论基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 完全随机设计方法。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 3 至 12 月在桂林医学院东城校区完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 15 只, 8 周龄, 体质量 (200±20) g, 雌雄不限, 由斯莱克景达实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK(湘)2016-0002。

1.3.2 实验主要试剂 低糖 DMEM/F12(赛默飞世尔科技公司); 胎牛血清(Gibco 公司); 青链霉素、胰蛋白酶(索莱宝公司); 碱性磷酸酶检测试剂盒(酶标法, 南京建成生物公司); 慢病毒空载体、慢病毒介导沉默 P75NTR 载体、HitransGP(上海吉凯基因公司); 成骨诱导液(Cyagen 赛业生物科技公司); CCK-8 试剂盒(日本同仁公司); anti-P75NTR 抗体(LSM Bio 公司); GAPDH、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(中杉金桥公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司); CD14、CD29、CD34 流式一抗(赛默飞世尔科技公司); FITC 标记二抗(上海生工生物股份公司); 脱钙骨

基质 (WRIGHT 公司); 碱性磷酸酶染色试剂盒 (改良钙沽法)、苏木精、伊红染色液 (索莱宝公司)。

1.3.3 实验主要仪器 显微镜 (荷兰飞利浦); SW-CJ-2F 型超净工作台 (苏州净化公司); 离心机 (Hettich 公司); CO₂ 恒温培养箱 (Thermo Scientific 公司); 流式细胞仪 (BIO-RAD 公司); 倒置相差显微镜 (OLYMPUS 公司); JSM-6390A 型扫描电镜 (JEOL 公司); MLDEL680 型酶标仪 (BIO-RAD 公司)。

1.4 方法

1.4.1 BMSCs 的体外分离培养和传代 取 8 周龄 SD 大鼠 3 只, 无菌原则取出双侧股骨, 10 mL 针头抽取低糖 DMEM, 反复冲出股骨干骨髓, 用 200 目筛过滤杂质后离心 5 min (1 000 r/min), 弃上清液, 低糖 DMEM 悬浮细胞 (含体积分数为 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素) 至 6 孔板培养, 放于 37 °C、体积分数为 5%CO₂ 培养箱。每日观察细胞的生长情况, 至细胞生长融合为 80% 左右, 胰蛋白酶消化、传代, 光学倒置相差显微镜观察第 3 代 BMSCs 的形状和生长状态。

1.4.2 BMSCs 的流式鉴定 选取第 3 代 BMSCs, 胰蛋白酶消化, 加入低糖 DMEM 完全培养基终止反应, 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 清洗细胞 3 次, 计数细胞后分别加入 PE 抗体标记的 CD14、CD29、CD34 抗体, 常温避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测。

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源: SD 大鼠股骨骨髓

原代培养方法: 全骨髓贴壁培养

基础培养基: DMEM/F12 培养基

添加材料: 体积分数为 10% 胎牛血清, 1% 青、链霉素

原代培养时间: 原代细胞培养 3 d 换液 1 次, 原代细胞培养 9 d 开始传代

细胞传代: 细胞融合至 90% 左右, 胰酶消化液按 1:2 消化传代, 每 9 d 传 1 代, 传至第 3 代用于实验研究

细胞鉴定: 流式细胞术检测细胞表面抗原

伦理学批准: 该实验经过桂林医学院动物实验伦理委员会批 (GLMC201805018)

1.4.3 慢病毒介导沉默 P75NTR 转染大鼠 BMSCs 的荧光表达 选取第 3 代 BMSCs, 胰蛋白酶消化后, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基重悬, 调节细胞浓度为 $5 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 。取 3 个 6 孔板, 分别标记为未转染组、阴性病毒对照组和沉默 P75NTR 转染组, 每孔添加 2.5 mL 细胞悬液, 待细胞融合 50% 左右, 计算感染复数值为 80 时, 阴性病毒转染组和沉默 P75NTR 病毒转染组分别添加空病毒载体和沉默 P75NTR 病毒载体 5 μL , 随后各添加 HitransGP 10 μL , 置于 37 °C、体积分数为 5%CO₂ 恒温培养箱继续培养, 96 h 后细胞换液, 7 d 后荧光倒置相差显微镜观察荧光表达。

1.4.4 Western blot 检测 P75NTR 蛋白表达 慢病毒介导沉默 P75NTR 转染 BMSCs 后第 7 天, 分别添加胰蛋白酶和细胞裂解液消化和裂解细胞, 低温高速离心后取上清液, BCA 蛋白定量, 蛋白电泳、转膜、牛奶封闭、一抗 4 °C 孵育过夜, 加入二抗、发光底物并在凝胶成像系统进行显影。

1.4.5 沉默 P75NTR 对 BMSCs 增殖活性的影响 慢病毒介导沉默 P75NTR 转染 BMSCs 两三天后, 每个 96 孔板加入 10 μL CCK-8 培养 4 h, 酶标仪测量其吸光度值, 连续测量 7 d, 以时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制细胞生长活性曲线。对照组为未转染细胞组和阴性病毒对照组。

1.4.6 沉默 P75NTR 对 BMSCs 成骨分化的影响 慢病毒介导沉默 P75NTR 转染 BMSCs 第 7 天, 改为成骨诱导液诱导培养。成骨诱导分化后第 7, 14 天收集细胞, 实验孔加入样品 30 μL , 空白孔和标准孔分别加入 30 μL 双蒸水和酚标准应用液, 再向每个孔加入缓冲液和基质液, 37 °C、体积分数为 5%CO₂ 恒温培养箱孵育 15 min, 加入显色剂, 酶标仪测定 490 nm 处的吸光度值。以时间为横轴, 吸光度值为纵轴绘制碱性磷酸酶活性曲线。

1.4.7 BMSCs 种植脱钙骨基质的体外观察 慢病毒介导沉默 P75NTR 转染 BMSCs 后, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 添加无菌脱钙骨基质复合培养。培养至第 5 天, 光学倒置相差显微镜下观察细胞黏附情况。培养至第 7 天, 戊二醛固定、PBS 冲洗、乙醇脱水、烘干、喷金镀膜, 扫描电镜观察细胞形态和附着情况。

1.4.8 植入体内组织学观察 未转染细胞组、阴性病毒对照组和沉默 P75NTR 转染组 BMSCs 复合脱钙骨基质成骨诱导培养 7 d, 分别构建 3 种组织工程骨复合体。3 种组织工程骨分别置入 12 只 SD 大鼠双侧皮下 4 周, 进行多聚甲醛固定、石蜡包埋切片和苏木精 - 伊红染色。

1.4.9 碱性磷酸酶染色观察 (改良钙沽法) 取上述 3 组第 4 周组织病理切片, 常规脱水、石蜡包埋和切片后, 碱性磷酸酶孵育液、硝酸钴溶液和碱性磷酸酶硫化工作液分别孵育 10 h, 5 min 和 2 min, 最后常规脱水、透明, 中性树脂封固, 光学倒置相差显微镜观察。

1.5 主要观察指标 沉默 P75NTR 对 BMSCs 活性和成骨分化的影响, 以及通过组织学和碱性磷酸酶染色观察转染后 BMSCs 复合脱钙骨基质的异位成骨能力。

1.6 统计学分析 运用 SPSS Statistics 20.0 软件进行统计学分析, 多组间的差异比较采用样本均数比较的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 BMSCs 的形状和生长状况 第 3 代 BMSCs 呈长梭形或者纺锤形, 细胞融合度 80% 以上, 部分细胞交叉重叠和伸出伪足, 见图 1。

2.2 BMSCs 表面标志物的鉴定结果 流式细胞仪分析结果显示, 第 3 代大鼠 BMSCs 表达 CD29 的阳性率为 91.40%, 而表达 CD14、CD34 的阳性率分别为 8.74%, 2.01%, 结果符合间充质干细胞的特征, 见图 2。

2.3 P75NTR 荧光蛋白表达 慢病毒介导沉默 P75NTR 转染 BMSCs 第 7 天, 荧光倒置相差显微镜下可见大量绿色荧光, 细胞形态良好, 感染复数为 80 时, 目的基因转染率可达

70%左右, 见图3。

2.4 Western blot 检测 P75NTR 蛋白的表达 未转染组和阴性病毒对照组 P75NTR 蛋白表达水平高于沉默 P75NTR 转染组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。沉默 P75NTR 转染组蛋白条带弱, 见图4。

2.5 沉默 P75NTR 对 BMSCs 增殖的影响 在转染前3 d, 细胞生长缓慢, 3组细胞数量大体一致, 处于低水平; 从第4天开始, 沉默 P75NTR 转染组细胞数量明显增加; 在转染后第5, 6天, 沉默 P75NTR 转染组细胞活性高于未转染组和阴性病毒对照组 ($P < 0.05$)。从第6天以后细胞生长速度缓慢, 3者之间对比无明显差异。未转染细胞组与阴性病毒对照组之间无明显差异, 见图5。

2.6 沉默 P75NTR 对 BMSCs 成骨特性的影响 在成骨诱导后第7, 14天, 沉默 P75NTR 转染组的碱性磷酸酶活性显著高于未转染组和阴性病毒对照组 ($P < 0.05$)。沉默 P75NTR 转染组第14天碱性磷酸酶活性高于第7天, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。未转染组和阴性病毒对照组之间无明显差异, 见图6。

2.7 沉默 P75NTR 转染 BMSCs 种植脱钙骨基质体外观察结果 光学倒置相差显微镜观察可见 BMSCs 黏附于脱钙骨基质上。扫描电镜观察骨髓间充质干细胞无规则聚集在脱钙骨基质支架孔隙间, 细胞之间可互相重叠。沉默 P75NTR 转染 BMSCs 可以良好黏附在脱钙骨基质支架材料上, 见图7。

2.8 苏木精-伊红染色组织学观察结果 3组皮下异位成骨均可见成骨组织和纤维细胞成束排列, 伴有较多炎症细胞浸润, 主要为淋巴细胞。沉默 P75NTR 转染组对比未转染组和阴性病毒对照组可见较多成骨组织形成, 见图8。

2.9 碱性磷酸酶染色结果 沉默 P75NTR 转染组、未转染组和阴性病毒对照组皆显示碱性磷酸酶阳性表达, 其中沉默 P75NTR 组主要呈黑色和深棕色, 另外2组呈棕色和浅棕色。颜色越深, 表示碱性磷酸酶的活性越高, 因此沉默 P75NTR 组碱性磷酸酶活性高于另外2组, 说明新生骨组织的能力强于未转染组和阴性病毒对照组, 见图9。

3 讨论 Discussion

骨形成方式主要包括膜内成骨和软骨成骨, 通过上调成骨细胞的活性和下调破骨细胞的活性促进骨的形成。BMSCs 因其体外扩增稳定、免疫原性低和定向分化等特点, 目前在组织工程中主要用于抗炎治疗、组织再生和骨缺损修复等方面^[15-16]。BMSCs 具有间充质干细胞的一般特性, 如强大的多向分化和自我更新能力, 在标准方法下可定向诱导分化为成骨细胞、成脂肪细胞、成软骨细胞和神经细胞等。P75NTR 是肿瘤坏死因子受体超家族的成员, 其结构复杂, 主要包含胞外区、跨膜区和胞内区3个区域, 具有广泛的生物学功能, 包括细胞生长、增殖、凋亡、神经发育和信号转导等^[17-18]。纤维蛋白的沉积和血管的形成是骨折愈合的重要机制, P75NTR 可抑制纤维蛋白的降解和血管的再生, 从

而抑制骨组织的形成, 导致骨折不愈合, 该调节通路主要通过下调丝氨酸内肽酶、组织纤溶酶原激活物 (t-PA) 和上调纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI-1) 来抑制纤维蛋白降解^[19]。在心血管系统中研究发现, P75NTR 的表达与血管内皮细胞损伤的时间相关, 表现为损伤时 P75NTR 含量增加, 修复血管内皮细胞 P75NTR 含量逐渐降低^[20]。在骨骼系统中研究发现, P75NTR 过表达抑制干细胞的成骨矿化作用, 其机制可能是骨折时 BMSCs 可以增殖并分化为成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞等, 形成动态平衡并促进成骨作用, 一旦促进成骨作用的平衡被打破, 某些成骨因子的减少或破骨细胞因子的增加会导致骨折不愈合、骨不连的形成^[21]。P75NTR 可能会阻碍骨折愈合甚至导致骨折不愈合, 这可能是由于 P75NTR 抑制了纤维蛋白降解和骨折形态周围的新生血管形成^[22]。在糖尿病患者骨折中研究发现, 骨折不愈合区域中存在大量的 P75NTR^[23]。课题组前期实验应用慢病毒构建过表达 P75NTR 转染 BMSCs, 体外成骨分化实验研究发现过表达 P75NTR 抑制 BMSCs 成骨分化, 具有成骨抑制作用^[24]; 研究发现, P75NTR 在骨折不愈合周围处于高表达, 而在骨折组织和正常组织中表达较低, 表明高表达 P75NTR 可能参与了骨折不愈合的形成^[25]。高表达的 P75NTR 可以通过 NF- κ B、JNK-p53-Bax 和神经酰胺 3 种不同途径介导 BMSCs 凋亡, 并抑制纤维蛋白降解和血管生成^[26-27]。P75NTR 对骨修复和再生具有双向作用, 过表达 P75NTR 可抑制细胞的增殖和成骨分化, 也有学者得出相反的结论, YANG 等^[28]探讨 P75NTR 对 SD 大鼠胚胎间充质干细胞成骨能力的影响, 结果表明 P75NTR 参与骨骼矿化作用, 被认为增强了成骨分化。LIU 等^[29]发现人骨髓间充质干细胞高表达神经源性标记物 P75NTR, 直接促进人骨髓间充质干细胞的成骨作用。神经生长因子与低亲和力受体 P75NTR 结合通过 JNK 通路促进细胞凋亡, 而与另一个高亲和力受体酪氨酸激酶受体 A (tyrosine kinase A, TrkA) 结合促进细胞增殖, TrkA 与 p75NTR 竞争性结合神经生长因子后, 启动下游激活或者凋亡通路是神经生长因子调节细胞生长增殖、凋亡等多种细胞反应的途径。另外, P75NTR 对 TrkA 有协调作用, 可提高细胞活性, 促进细胞增殖。P75NTR 结构的复杂性决定着其生物多样性, 在不同系统起着不同的生物作用, 在相同系统中不同的反应环境和矿化条件表现出的生物活性也不一样。作者猜想, P75NTR 在不同系统中起的作用可能与 P75NTR 在该系统的量和表达有关, 在低表达的系统中 (组织、细胞), P75NTR 对该系统主要起正向调节作用, 在高表达的系统中 (癌组织、骨折不愈合组织), 其对该系统主要起负向调节作用, 而在正常表达的组织中可能处于一个动态表达过程。P75NTR 在不同的应激和反应下可以通过不同的信号通路来决定其生物学功能, 这些功能可表现出相反的生物学效应。沉默 P75NTR 对 BMSCs 的影响只是最终生物学结果表现, 其中涉及复杂的生物过程和反应调节, 通过沉默 P75NTR, 关闭凋亡通路, 促进细胞增殖, 从而起到正向调节作用。

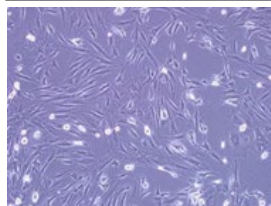
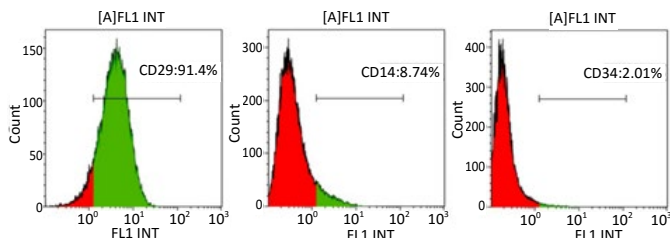


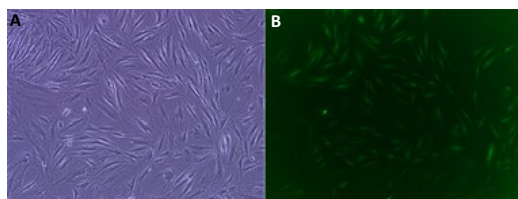
图 1 | 第 3 代骨髓间充质干细胞形态 (倒置相差显微镜, ×100)
Figure 1 | Morphology of the third generation of bone marrow mesenchymal stem cells (inverted phase contrast microscope, ×100)



图注: 第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞表达 CD29 的阳性率为 91.40%, 而表达 CD14、CD34 的阳性率分别为 8.74%, 2.01%

图 2 | 骨髓间充质干细胞流式细胞鉴定

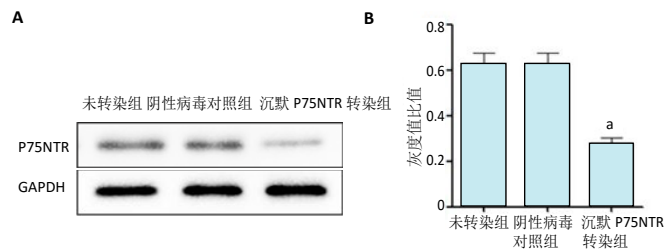
Figure 2 | Flow cytometric identification of bone marrow mesenchymal stem cells



图注: 图中 A 为正常视野下的骨髓间充质干细胞; B 为同一视野下, 转染后骨髓间充质干细胞的荧光表达

图 3 | 慢病毒感染后第 7 天的绿色荧光蛋白表达 (倒置荧光相差显微镜, ×100)

Figure 3 | Green fluorescent protein expression on day 7 after lentiviral infection (inverted fluorescence phase contrast microscope, ×100)



图注: 图中 A 为慢病毒感染大鼠骨髓间充质干细胞后第 7 天的 P75NTR 蛋白表达条带; B 为各组骨髓间充质干细胞感染后第 7 天的 P75NTR 蛋白条带灰度值与 GAPDH 内参灰度值的比值, 与未转染组和阴性病毒对照组比较, $^aP < 0.05$

图 4 | Western blot 检测骨髓间充质干细胞 P75NTR 蛋白的表达

Figure 4 | Western blot detection of P75NTR protein expression of bone marrow mesenchymal stem cells

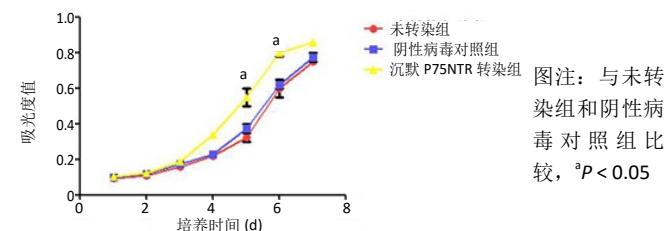


图 5 | 各组骨髓间充质干细胞的生长活性

Figure 5 | Growth activity of bone marrow mesenchymal stem cells in each group

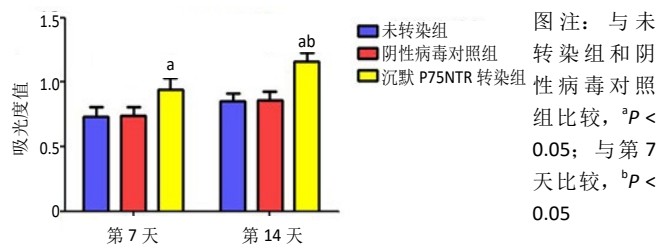
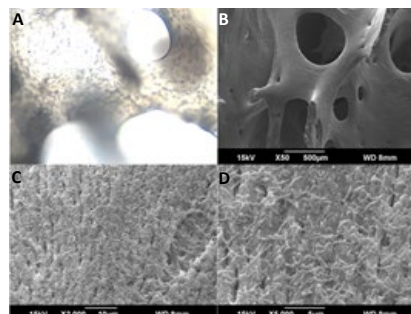


图 6 | 各组骨髓间充质干细胞成骨诱导第 7 天和第 14 天的碱性磷酸酶活性

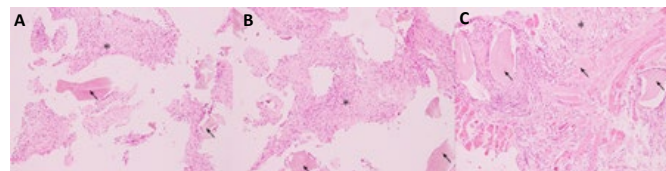
Figure 6 | Alkaline phosphatase activity of bone marrow mesenchymal stem cells in each group at 7 and 14 days after osteogenic induction



图注: 图中 A 为光学倒置相差显微镜下观察骨髓间充质干细胞和脱钙骨基质黏附情况 (×100); B-D 分别在 50, 2 000 和 5 000 倍扫描电镜观察骨髓间充质干细胞和脱钙骨基质黏附情况

图 7 | 光学倒置相差显微镜和扫描电镜观察骨髓间充质干细胞在脱钙骨基质上的黏附情况

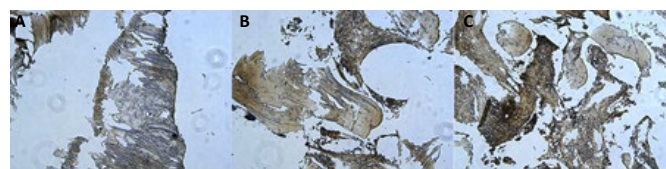
Figure 7 | Adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells on the demineralized bone matrix observed by optical inverted phase contrast microscope and scanning electron microscope



图注: 图中 A 为未转染组; B 为阴性病毒对照组; C 为沉默 P75NTR 转染组。箭头所示为成骨组织, 星号所示为纤维结缔组织。沉默 P75NTR 转染组对比未转染组和阴性病毒对照组可见较多成骨组织形成

图 8 | 各组组织工程骨复合体皮下异位成骨组织学观察 (苏木精 - 伊红染色, ×100)

Figure 8 | Histological observation of subcutaneous ectopic osteogenesis of tissue engineered bone complex in each group (hematoxylin-eosin staining, ×100)



图注: 图中 A 为未转染组; B 为阴性病毒对照组; C 为沉默 P75NTR 转染组。沉默 P75NTR 转染组主要呈黑色和深棕色, 其他 2 组呈棕色和浅棕色。颜色越深, 表示碱性磷酸酶的活性越高

图 9 | 各组组织工程骨复合体皮下异位成骨碱性磷酸酶染色观察 (光学倒置相差显微镜, ×100)

Figure 9 | Alkaline phosphatase staining of subcutaneous ectopic osteogenesis of tissue engineered bone complex in each group (optical inverted phase contrast microscope, ×100)

该研究探讨慢病毒介导沉默 P75NTR 转染 BMSCs 对细胞增殖活性和成骨分化的影响, 将其种植脱钙骨基质后进行体内异位成骨能力分析, 首先通过慢病毒介导沉默 P75NTR 转染 BMSCs, 沉默 P75NTR 可以关闭细胞凋亡通道, 一定程度上增加细胞增殖活性和碱性磷酸酶活性; 再将沉默 P75NTR 转染后 BMSCs 与脱钙骨基质构成组织工程骨复合体, BMSCs 可在脱钙骨基质上进行黏附、爬行和分泌因子; 最后验证两者结合的异位成骨作用, 体内实验显示两者结合具一定促进成骨作用, 为骨组织工程治疗骨缺损提供重要的理论基础。

综上所述, 沉默 P75NTR 转染 BMSCs 复合脱钙骨基质构成组织工程骨复合体具有一定的异位成骨能力, 关闭 P75NTR 介导的凋亡通道, 不仅可以提高细胞活性, 还能更好地促进骨组织再生。

作者贡献: 实验设计为贝朝涌, 实验具体实施为陈俊毅, 文献查询及实验评价为王宁、彭称飞, 实验结果收集整理为朱伦井、段江涛、王烨, 实验结果分析统计及文章撰写为陈俊毅。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81660366)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在该实验项目研究、文章撰写及发表过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经桂林医学院动物实验伦理委员会批准(批准编号为 GLMC201805018)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过桂林医学院附属医院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] GÓMEZ-BARRENA E, ROSSET P, LOZANO D, et al. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015;70:93-101.
- [2] BLÖCHL A, BLUMENSTEIN L, AHMADIAN MR. Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci*. 2004;20(9):2321-2335.
- [3] COLE HA, OHBA T, NYMAN JS, et al. Fibrin accumulation secondary to loss of plasmin-mediated fibrinolysis drives inflammatory osteoporosis in mice. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(8):2222-2233.
- [4] NYKJAER A, WILLNOW TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci*. 2012;35(4):261-270.
- [5] TWISS JL, CHANG JH, SCHANEN NC. Pathophysiological mechanisms for actions of the neurotrophins. *Brain Pathol*. 2006;16(4):320-332.
- [6] ALDER J, FUJIOKA W, GIARRATANA A, et al. Genetic and pharmacological intervention of the p75NTR pathway alters morphological and behavioural recovery following traumatic brain injury in mice. *Brain Inj*. 2016;30(1):48-65.
- [7] SHEN J, CHEN X, LI H, et al. p75 neurotrophin receptor and its novel interaction partner, NIX, are involved in neuronal apoptosis after intracerebral hemorrhage. *Cell Tissue Res*. 2017;368(1):13-27.

- [8] WANG YX, XU K, SU WL, et al. Therapeutic effects of p75 tumor necrosis factor receptor monoclonal antibody on a rat model of traumatic arthritis. *J Surg Res*. 2014;186(1):234-239.
- [9] WEN X, LIU L, DENG M, et al. Characterization of p75(+) ectomesenchymal stem cells from rat embryonic facial process tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427(1):5-10.
- [10] ZHAO M, WEN X, LI G, et al. The capacity and biological characteristic of the p75 neurotrophin receptor-positive ectomesenchymal stem cell in vitro. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2015;50(2):103-109.
- [11] RADA T, REIS RL, GOMES ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(1):64-76.
- [12] EDALAT H, HAJEBRAHIMI Z, MOVAHEDIN M, et al. p75NTR suppression in rat bone marrow stromal stem cells significantly reduced their rate of apoptosis during neural differentiation. *Neurosci Lett*. 2011;498(1):15-19.
- [13] BARCELONA PF, SITARAS N, GALAN A, et al. p75NTR and Its Ligand ProNGF Activate Paracrine Mechanisms Etiological to the Vascular, Inflammatory, and Neurodegenerative Pathologies of Diabetic Retinopathy. *J Neurosci*. 2016;36(34):8826-8841.
- [14] SCHWABE P, SIMON P, KRONBACH Z, et al. A pilot study investigating the histology and growth factor content of human non-union tissue. *Int Orthop*. 2014;38(12):2623-2629.
- [15] RACKWITZ L, REICHERT JC, HAVERSATH M, et al. Cell-based and future therapeutic strategies for femoral head necrosis. *Orthopade*. 2018;47(9):770-776.
- [16] 张凯, 王毅, 邢国胜. 间充质干细胞的生物学特性及多向分化潜能 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008,12(3):539-542.
- [17] VILAR M, CHARALAMPOPOULOS I, KENCHAPPA RS, et al. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron*. 2009;62(1):72-83.
- [18] TOMELLINI E, LAGADEC C, POLAKOWSKA R, et al. Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: more than just a marker. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(13):2467-2481.
- [19] SACHS BD, BAILLIE GS, MCCALL JR, et al. p75 neurotrophin receptor regulates tissue fibrosis through inhibition of plasminogen activation via a PDE4/cAMP/PKA pathway. *J Cell Biol*. 2007;177(6):1119-1132.
- [20] ELSHAER SL, EL-REMESSY AB. Implication of the neurotrophin receptor p75NTR in vascular diseases: beyond the eye. *Expert Rev Ophthalmol*. 2017;12(2):149-158.
- [21] MIKAMI Y, ISHII Y, WATANABE N, et al. CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev*. 2011;20(5):901-913.
- [22] KARNES JM, DAFFNER SD, WATKINS CM. Multiple roles of tumor necrosis factor-alpha in fracture healing. *Bone*. 2015;78:87-93.
- [23] KO KI, COIMBRA LS, TIAN C, et al. Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF α -mediated mechanism. *Diabetologia*. 2015;58(3):633-642.
- [24] 朱伦井, 段江涛, 黄义杰, 等. 过表达 P75 神经生长因子受体负向调控骨髓间充质干细胞的成骨分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(1): 20-26.
- [25] 李家勇, 王铭, 彭称飞, 等. P75NTR 在兔骨折不愈合局部组织中的表达及意义 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017,23(4):437-440.
- [26] ASSIMAKOPOULOU M, KONDYLI M, GATZOUNIS G, et al. Neurotrophin receptors expression and JNK pathway activation in human astrocytomas. *BMC Cancer*. 2007;7:202.
- [27] SUHL KH, PARK JB, PARK EY, et al. Effect of nerve growth factor and its transforming tyrosine kinase protein and low-affinity nerve growth factor receptors on apoptosis of notochordal cells. *Int Orthop*. 2012;36(8):1747-1753.
- [28] YANG K, WANG Y, JU Y, et al. p75 neurotrophin receptor regulates differential mineralization of rat ectomesenchymal stem cells. *Cell Prolif*. 2017;50(1):e12290.
- [29] LIU Q, LEI L, YU T, et al. Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on the Neurogenesis and Osteogenesis in Bone Engineering. *Tissue Eng Part A*. 2018;24(15-16):1283-1292.